

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kristýna Jelínková

Vliv slin krevsajícího hmyzu (Nematocera) na imunitní systém člověka

Interactions of human immune system with saliva of bloodfeeding Nematocera

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Iva Kolářová, PhD.

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 13.8.2019

.....

Kristýna Jelínková

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Ivě Kolářové, jejíž obětavá trpělivost a ochota mi vždy pomoci a poradit pro mne byla po celou dobu psaní nesmírně důležitá. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a víru v dokončení mé práce, a také celé laboratoři profesora Volfa za milé přijetí.

Abstrakt

Pobodání zástupci krevsajícího hmyzu z podřádu Nematocera vyvolává u člověka imunitní reakci. Sliny některých zástupců čeledí Psychodidae, Culicidae, Simuliidae a Ceratopogonidae byly zkoumány podrobněji ve smyslu konkrétních antigenů, které ovlivňují hostitelovu humorální i buněčnou imunitní odpověď. Dostupné studie na toto téma jsou zaměřené především na komáry (Culicidae) a flebotomy (Psychodidae).

Protilátková odpověď na sliny komárů a flebotomů je založena hlavně na specifických protilátkách tříd IgE a IgG. Hladiny těchto protilátek v sérech pobodaných lidí jsou ovlivněny zejména délkou a intenzitou předchozí expozice pobodání. U komárů je významná IgE odpověď, spojená s častými alergickými reakcemi na komáří pobodání. U flebotomů naproti tomu převládá IgG protilátková odpověď.

Buněčná reakce lidského imunitního systému na komáří sliny byla zkoumána pouze okrajově, přičemž komplexnější studie nejsou dostupné. U flebotomů bylo prokázáno, že přídavek slin rodu *Lutzomyia* a *Phlebotomus* vyvolává proliferaci lidských PBMC z opakovaně pobodaných osob. Produkce cytokinů lidskými PBMC a exprese kostimulačních molekul monocytů, makrofágů a dendritických buněk jsou také ovlivněny přítomností slin flebotomů.

Pobodání muchničkami je u lidí studováno velmi okrajově, u tiplíků nejsou studie o vlivu jejich slin na imunitní systém člověka dostupné.

Klíčová slova: Nematocera, sliny, imunitní odpověď, člověk, protilátky, PBMC, cytokiny

Abstract

In humans, the bites of bloodfeeding insects from the suborder Nematocera induce an immune reaction, both humoral and cell-mediated. Some antigens presented in the saliva of some insect families - Psychodidae, Culicidae, Simuliidae and Ceratopogonidae – are studied more deeply to reveal their immunomodulatory and antigenic properties. Most studies are focused on mosquitos (Culicidae) and sand flies (Psychodidae).

Mosquito saliva elicits primarily IgG and IgE antibodies. The level of antibodies in the sera of bitten individuals reflects the length and intensity of previous exposure to insect bites. Anti-saliva IgE antibodies play an important role in response to the mosquito bites and are frequently associated with allergic reactions. On the other hand, sand fly saliva elicits primarily IgG antibodies.

Cell-mediated human immune response to mosquito bites is a neglected research topic. It has been proven that the saliva of sand flies (genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*) stimulates proliferation of PBMC from repeatedly bitten humans. Cytokine production by human PBMC and expression of costimulatory molecules in human monocytes, macrophages, and dendritic cells are also influenced by the presence of sand fly saliva.

So far as we know, there are only few studies on human immune response to black fly bites, and the effect of saliva of biting midges on the human immune system have not been studied yet.

Key words: Nematocera, saliva, immune response, human, antibodies, PBMC, cytokines

Obsah

1. Úvod	1
2. Culicidae	2
2.1. Protilátková odpověď na sliny komárů	3
2.2 Buněčná a cytokinová odpověď na sliny komárů	8
3. Psychodidae	9
3.1. Protilátková odpověď na sliny flebotomů	9
3.2 Buněčná a cytokinová odpověď na sliny flebotomů	13
3.2.1 Vliv slin flebotomů na proliferaci lidských PBMC	13
3.2.2 DTH reakce na pobodání flebotomy	13
3.2.3 Vliv slin flebotomů na expresi kostimulačních molekul imunitních buněk	14
3.2.4 Vliv slin flebotomů rodu <i>Phlebotomus</i> na produkci cytokinů	15
3.2.5 Vliv slin flebotomů rodu <i>Lutzomyia</i> na produkci cytokinů	16
4. Simuliidae	17
5. Ceratopogonidae	18
6. Závěr	20
7. Seznam literatury.....	22

Seznam použitých zkratek

ADA – Adenosin deamináza

ADP – Adenosindifosfát

ATP – Adenosintrifosfát

CL – (Cutaneous leishmaniasis) Kutánní leishmanióza

DTH – (Delayed type hypersensitivity) Opožděná hypersenzitivní reakce

ELISA – (Enzyme-linked immunosorbent assay)

HMB – (Hypersensitivity to mosquito bites) Hypersenzitivní reakce na komáří pobodání

HLA – (Human leukocyte antigens) Hlavní histokompatibilní systém člověka

IBH – (Insect bite hypersensitivity) Hypersenzitivní reakce na hmyzí pobodání

IFN- γ – Interferon gamma

IgA – Imunoglobulin A

IgE – Imunoglobulin E

IgG – Imunoglobulin G

IgM – Imunoglobulin M

IL – Interleukin

LPS – Lipopolysacharid

miRNA – (Micro ribonucleid acid) Mikro ribonukleová kyselina

mRNA – (Messenger ribonucleid acid) Mediátorová ribonukleová kyselina

NK buňky – (Nature killer cells)

NKT cells – (Nature killer T cells)

OBP – Odorant binding protein

PBMC – (Periferal blood mononuclear cells) Mononukleární buňky periferní krve

RANTES – Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted

SG – (Salivary gland) Homogenát/Sonikát/Extrakt slinných žláz

TGF- β – (Transforming growth factor β) Transformující růstový faktor beta

TNF – (Tumor-necrosis factor) Tumor nekrotizující faktor

Treg – T regulační lymfocyty

VL – (Visceral leishmaniasis) Viscerální leishmanióza

WBE – (Whole body extract) Extrakt z celého těla

WHO – (World health organization) Světová zdravotnická organizace

1. Úvod

Z výsledků mnoha studií je obecně známo, že sliny krevsajícího hmyzu uvolňované při sání krve do hostitele interagují se složkami jeho imunitního systému. Tato interakce mezi parazitem a hostitelem může hrát zásadní roli při přenosu a uchycení některých hmyzem přenášených patogenů. Ovlivnění imunitní reakce hostitele určitým směrem tak může napomáhat buď rozvoji onemocnění způsobených těmito patogeny, nebo před ním naopak napadeného jedince chránit.

Podřád Nematocera zahrnuje pro člověka z medicínského pohledu významné čeledi Culicidae, Psychodidae, Simuliidae a Ceratopogonidae. Zástupci těchto čeledí se živí i na lidech a patří mezi přenašeče celosvětově významných onemocnění (např. malárie, říční slepota, horečka Dengue, žlutá zimnice, leishmanióza), způsobujících podle Světové zdravotnické organizace (WHO) smrt několika stovek tisíc lidí ročně. Studium odpovědi imunitního systému na sliny zástupců krevsajícího hmyzu je proto velmi aktuální a perspektivní oblastí výzkumu, zejména z hlediska vývoje vakcín proti přenášeným patogenům.

Velké množství experimentů na toto téma bylo provedeno na myších modelech, které jsou v mnoha ohledech vhodnou alternativou pro zkoumání imunitního systému člověka. Výsledky těchto studií nám pomáhají přiblížit a objasnit fungování lidského imunitního systému především tam, kde je to v běžné praxi u člověka obtížně realizovatelné. Imunitní systém člověka má však od toho myšího mnoho odlišností, a proto poznatky získané na myších modelech nelze na člověka aplikovat přímo. V celkových závěrech o konkrétních formách imunitní odpovědi člověka na sliny krevsajícího hmyzu tak hrají experimenty zkoumající přímo složky jeho imunitního systému nezastupitelnou roli.

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o imunitní reakci člověka na sliny krevsajících zástupců podřádu Nematocera, a to jak v případě protilátkové, tak i buněčné a cytokinové imunitní odpovědi.

2. Culicidae

Komáři (Culicidae) jsou celosvětově rozšíření krevsající členovci, u kterých se naprostá většina zástupců vyskytuje v tropických a subtropických oblastech. V rámci čeledi Culicidae již bylo popsáno více než 1500 druhů, rozšířených kosmopolitně s výjimkou nejchladnějších oblastí (Capinera, 2008).

Komáři patří mezi hlavní přenašeče lidských patogenů, pro člověka v mnoha případech život ohrožujících. Řadí se mezi ně původci horečky Dengue, malárie, Západonilské horečky, virového onemocnění Zika a žluté zimnice (Smith *et al.*, 2012). Pro člověka jsou z tohoto hlediska nejvýznamnější rody *Anopheles* (přenašeči původců lidské malárie a filariózy), *Aedes* (přenašeči původců žluté zimnice, horečky Dengue a Chikungunyany) a *Culex* (přenašeči původců Západonilské horečky, filariózy a Japonské encefalitidy) (Berenger a Parola, 2017).

Imunitní odpověď na sliny komárů

Pobodání komáry vyvolává u člověka imunitní reakci. Prvotní vystavení antigenům z komářích slin je bez reakce a až opakovaná expozice slinám komárů způsobuje imunitní odpověď hostitele (Peng a Simons, 2007). Z klinického hlediska má odpověď na komáří bodnutí zpravidla 5 základních fází, které se mění v důsledku intenzity a délky vystavení hostitele komářím bodnutím (Oka a Ohtaki, 1989). Lidé, kteří se předtím nikdy nesetkali s komáry, na první pobodání nijak nereagují (1. fáze). Při opakované expozici (2. fáze) se po 24 hodinách projevuje opožděná kožní hypersenzitivní reakce III. typu, mající podobu otoku a zarudnutí pokožky. Pokud expozice komářím pobodáním pokračuje, dochází ke třetí fázi, pro kterou je typická kombinovaná časná a opožděná hypersenzitivní reakce I. a III. typu. Časná reakce se objevuje po 15 minutách od pobodání v podobě puchýřků. Další opakovaná expozice komárům (4. fáze) už nevyvolává opožděnou kožní reakci, vyskytuje se pouze okamžitá, opět ve formě puchýřků. Při dlouhodobém vystavení vysokému počtu komářích bodnutí (5. fáze) se vytrácí i časná kožní reakce a dochází ke ztrátě citlivosti hostitele, který se tak stává tolerantní ke komářím pobodáním (Billingsley *et al.*, 2006, Cantillo *et al.*, 2014, Mellanby, 1946).

Reakce na komáří bodnutí se u jednotlivců mohou lišit od lokální reakce až po systémovou reakci typu anafylaktický šok (Cantillo *et al.*, 2014). V ojedinělých případech mohou být projevy imunitní reakce na komáří pobodání také v podobě tzv. Skeeter syndromu (Simons a Peng, 2005). Skeeter syndrom má u lidí formu lokální zánětlivé reakce velkého rozsahu, která je spojena s horečkami. Objevuje se především u dětí, imunosuprimovaných pacientů a lidí, kteří se doposud s konkrétním druhem komára nesetkali (Simons a Peng, 2005).

2.1. Protilátková odpověď na sliny komárů

Komáří pobodání vyvolává tvorbu specifických protilátek tříd IgE a IgG (konkrétně IgG4 a IgG1) (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994, Peng *et al.*, 1996). Velikost okamžité i opožděné kožní reakce pozitivně koreluje s hladinou těchto specifických protilátek (Peng *et al.*, 1996).

Faktory ovlivňující imunitní reakci na sliny komárů

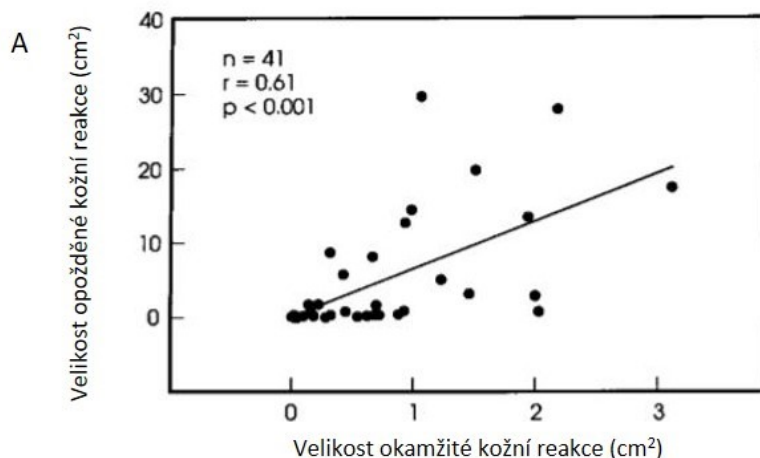
Existuje více faktorů, na kterých je protilátková odpověď pobodaného hostitele závislá. Mezi nejvýznamnější patří intenzita a délka expozice, období výskytu komárů a stav imunitního systému hostitele (Billingsley *et al.*, 2006).

Protilátková odpověď na antigeny z komářích slin má dynamický charakter, který souvisí s délkou expozice komárům a v některých částech světa má tak spojitost se sezonním výskytem komárů. Zvýšené množství specifických anti-slinných protilátek po skončení komáří sezony oproti měření před jeho začátkem, experimentálně prokázali například Peng *et al.* (2002a), Palosuo *et al.* (1997), Remoue *et al.* (2007) a Billingsley *et al.* (2006).

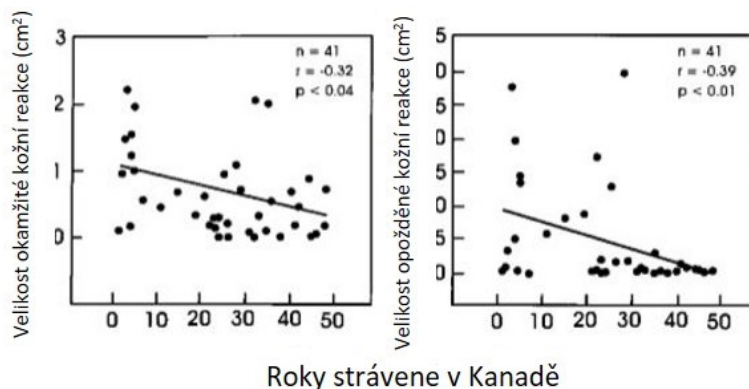
Při výzkumu protilátek na antigeny slin *Aedes aegypti* u senegalských dětí ve věku od 1-6 let byl naměřen rozdíl v hladinách specifických protilátek před a po deštivém období, které v této oblasti trvá 6 měsíců, a je při něm největší výskyt komárů. V průběhu tohoto sezonního výskytu komárů u nich vzrostla hladina specifických IgG4 a IgE protilátek, a tato odpověď byla zároveň věkově závislá (Remoue *et al.*, 2007). Stejně tak byly na konci 3 měsíční komáří sezóny zaznamenány zvýšené hladiny specifických protilátek IgG1, IgG4 a IgE proti antigenům ze slinách *Ae. communis* u 14 testovaných osob z Finska (Palosuo *et al.*, 1997). Zvýšená hladina specifických IgG protilátek proti slinám *Ae. vexans* byla naměřena na konci letního výskytu komárů v sérech odebraných skupině dobrovolníků z Kanady, přičemž ale hladina IgE nebyla nijak ovlivněna. Je však nutné zdůraznit, že se v případě měření před a po sezonním výskytu komárů nejednalo o stejné dobrovolníky a výsledky tak mohou být od ostatních studií odlišné (Peng *et al.*, 2002a). Analogický experiment k měření specifických anti-slinných protilátek v průběhu komáří sezony přinesli Orlandi-Pradines *et al.* (2007). V jejich výzkumech sledovali vývoj hladin protilátek tříd IgG a IgM u skupiny cestovatelů přirozeně vystavených na dva měsíce bodnutím *Anopheles gambiae* a *Ae. aegypti*. Zastoupení protilátek proti antigenům těchto komárů bylo vyhodnocováno v různých časových intervalech, a to před pobytem cestovatelů v oblasti výskytu komárů, během jejich pobytu v této oblasti, 2 měsíce po pobytu v oblasti a 3 měsíce po návratu do místa bez výskytu komárů *An. gambiae* a *Ae. aegypti*. Hladina protilátek IgG proti antigenům ze slin *An. gambiae* se zvyšovala pouze na přechodnou dobu, a to při pobytu v oblasti s komáry. Po 3 měsících od této expozice se jejich hladina opět snížila téměř na původní hodnoty. Oproti tomu protilátková odpověď IgG na antigeny *Ae. aegypti* sice také signifikantně narůstala po dobu expozice komárům, ale její pokles po 3 měsících od této doby byl zanedbatelný. U protilátek typu IgM nebyly naměřené žádné rozdíly v průběhu testovaného období (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007). Závislost

imunitní odpovědi na potenciální délce expozice komárů zkoumali ve svých pokusech také Peng *et al.* (1996). U testovaných jedinců ve věku od 19 do 57 let, kteří se přestěhovali do Kanady před 2-15 lety, byla velikost puchýřů v kůži po aplikaci SG *Ae. vexans* nepřímo úměrná počtu let strávených v Kanadě viz obrázek č. 1 (Peng *et al.*, 1996). Intenzivní vystavení slinám komárů v průběhu období několika měsíců tak působí nárůst specifických protilátek v těle hostitele (Palosuo *et al.*, 1997, Billingsley *et al.*, 2006, Remoue *et al.*, 2007)

Stav imunitního systému hostitele může být ovlivněn mimo jiné věkem. Souvislost mezi věkem hostitele a jeho imunitní odpovědí na komářím slině byla pozorovaná v několika experimentech. Při výzkumu protilátek proti slinám *Ae. aegypti* u dětí v Senegalu od 1-6 let byly naměřeny věkově závislé rozdíly ve specifických anti-komářích protilátkách. U 4-letých dětí byla zvýšená hladina IgE oproti ostatním věkovým skupinám a zároveň u 1-2 letých byla vyšší hladina IgG4. V tomto případě se jedná pravděpodobně o věkově a isotypově závislou odpověď a je zde možná souvislost s protilátkovou adaptací dětí (Remoue *et al.*, 2007). Stejně tak i v jiné studii protilátkové odpovědi byly u dětí, již vystaveným komářím pobodáním, zaznamenány určité rozdíly v jednotlivých věkových skupinách. Ve skupině kanadských dětí ve věku od 1 měsíce do 18 let hladina specifických anti-slinných IgE protilátek vrcholila v období 6-12 měsíce života a hladina IgG byla nejvyšší u 1-6 měsíčních dětí. Poklesy v hladinách těchto imunoglobulinů se projevily po 5. roce, a i nadále zůstaly nižší oproti předešlým měřením (Peng *et al.*, 2002b). Oproti tomu testování dospělí různého věku nejevili v několika měřeních žádné odlišnosti v hladině specifických anti-komářích protilátek v porovnání s ostatními zkoumanými věkovými skupinami (Peng *et al.*, 1996, Peng *et al.*, 2002a). Z dostupných studií tak vyplývá, že imunitní odpověď na pobodání komáry je u dětí do 6 let věkově závislá (Peng *et al.*, 2002b, Remoue *et al.*, 2007).



A: Vztah mezi okamžitou a opožděnou kožní reakcí na komáří bodnutí



Obr. č. 1: Korelace mezi počtem let strávených v Kanadě a velikostí opožděné a okamžité reakce na komáří bodnutí (převzato a upraveno z Peng *et al.*, 1996)

Alergická reakce na komáří pobodání

Specifické IgE protilátky proti antigenům z komářích slin jsou asociovány jak s lokální a systémovou reakcí, tak i s reakcí okamžitou a opožděnou a jejich účast v alergiích byla prokázána opakovaně (Cantillo *et al.*, 2014). Alergická reakce na komáří pobodání se projevuje zpravidla otokem a zarudnutím pokožky obvykle o rozsahu nad 3 cm v okolí místa bodnutí a různé kožní projevy mohou přetrvávat i několik týdnů od pobodání komáry (Crisp a Johnson, 2013). Dobrovolníci z Asie a Ameriky, kteří byli pobodáni *Ae. vexans*, měli silnější specifickou IgE protilátkovou odpověď, pokud se u nich projevila alergická a kožní reakce (Peng *et al.*, 1998). Specifická IgE protilátková odpověď v alergii na antigeny z komářích slin *Ae. aegypti* byla dále prokázána i pomocí Prausnitz-Künsterova testu. Ten je založen na principu intradermálního přenosu séra z alergického jedince do zdravého, který je posléze vystaven konkrétnímu antigenu a je sledována jeho kožní reakce (Cohen a Zelaya-Quesada, 2004). V tomto případě došlo pomocí séra z alergického jedince k přesunu časné kožní hypersenzitivní reakce do dvou

nealergických dobrovolníků. V jejich séru pak byla prokázána reakce IgE protilátek s antigeny z komářích slin (Reunala *et al.*, 1994).

Ve vývoji alergické reakce jsou dále vysoce pravděpodobně zahrnuty i specifické IgG protilátky. Studie naznačují, že se tak děje při hypersenzitivní reakci III. typu, kdy dochází k tvorbě imunokomplexů z antigenů a specifických IgG protilátek. Navázání tohoto komplexu na komplement pak vyvolává zánětlivou odpověď (Peng *et al.*, 1996, Peng a Simons, 2004a).

Bylo popsáno také několik případů systémové reakce na komáří bodnutí. U těchto jedinců byla po komářím pobodání (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. vexans*, *Culex quinquefasciatus* a *An. stephensi*) naměřena prokazatelně vyšší hladina IgE oproti kontrole, u kterých byl test na komáří antigeny negativní. Při systémové reakci na komáří antigeny nebyla zvýšena hladina specifických IgG (Peng *et al.*, 2004b).

Alergeny ve slinách komárů

Experimentálně se ve slinách komárů podařilo identifikovat několik molekul, které jsou odpovědné za tvorbu alergických reakcí. Analýza slin druhů *Ae. aegypti*, *Ae. vexans*, *Ae. triseriatus*, *Cx. tarsalis* a *Culiseta inornata* a SG z *Ae. albopictus*, *Ae. togoi*, *Cx. pipiens* a *An. sinensis* odhalila 3 až 16 alergenů u každého komára. Jednalo se o různé látky o velikosti 16-95 kDa. Jejich přehled je uvedený na obrázku č.2. Nejsilnější IgE protilátkovou odpověď vyvolaly alergen y z *Ae. aegypti*, *Ae. vexans* a *Ae. albopictus*, které patří mezi hlavní druhy sající na člověku (Peng *et al.*, 1998).

Ae. aegypti je nejrozšířenějším druhem komára ve světě a z jeho slin byly identifikovány 4 alergenní proteiny. Jedná se o 68 kDa apyrázu (Aed a 1), 37 kDa D7 protein (Aed a 2), 30 kDa (Aed a 3) a 67 kDa α -glukosidáza (Aed a 4). Rekombinantní formy těchto alergenů vázaly v sérech jedinců alergických na komáří pobodání IgE a IgG protilátky (Xu *et al.*, 1998, Peng *et al.*, 2001, Peng a Simons, 2004a, Peng *et al.*, 2006, Peng *et al.*, 2016)

Marker (kd)	<i>Ae. aegypti</i> (saliva)	<i>Ae. vexans</i> (saliva)	<i>Ae. albopictus</i> (SGE)	<i>Ae. togo</i> (SGE)	<i>Ae. triseriatus</i> (saliva)	<i>Cx. quinquefasciatus</i> (SGE)	<i>Cx. pipiens</i> (SGE)	<i>Cx. tarsalis</i> (saliva)	<i>An. sinensis</i> (SGE)	<i>Cs. inornata</i> (saliva)
95	—	—	95 (1/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—
75	—	75 (4/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—	—
70	—	—	—	—	—	70 (1/11,0/5)	70 (2/12,0/5)	—	—	—
68	68 (11/12,5/5)*	68 (11/12,4/5)	68 (6/12,0/5)	—	68	—	—	—	—	68
61.5	61.5 (6/12,1/5)	—	61.5 (11/12,4/5)	—	—	—	61.5 (4/12,0/5)	—	—	—
57.5	—	57.5 (3/12,0/5)	—	57.5 (4/12,0/5)	—	—	—	—	—	—
55.5	55.5 (11/12,3/5)	—	—	—	—	55.5 (1/11,0/5)	55.5 (9/12,1/5)	—	—	—
54	—	54 (6/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—	—
51.5	—	—	51.5 (2/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—
50	50 (11/12,5/5)	—	50 (12/12,4/5)	—	—	50 (8/11,1/5)	—	—	—	—
46.5	—	—	—	—	—	—	—	46.5 (3/11,0/5)	—	—
42.5	—	—	—	—	—	—	—	42.5	—	—
41	—	—	—	—	—	41 (7/11,5/5)	—	41	—	—
39	—	39 (12/12,5/5)	—	—	—	—	39 (9/12,2/5)	—	—	39
38	—	—	—	—	—	—	38 (1/12,0/5)	38	—	—
37	37 (12/12,5/5)	37 (12/12,5/5)	37 (11/12,4/5)	37 (12/12,5/5)	37	37 (10/11,5/5)	—	37	—	37
35.5	—	—	35.5 (12/12,4/5)	—	—	35.5 (7/11,2/5)	—	—	—	—
34	—	—	—	—	—	—	34 (12/12,4/5)	—	—	—
33	33 (7/12,0/5)	—	33 (3/12,0/5)	33 (5/12,0/5)	—	33 (10/11,5/5)	—	—	33 (11/11,4/5)	—
31.5	—	—	—	—	31.5	—	—	—	—	—
30.5	30.5 (5/12,0/5)	30.5 (11/12,4/5)	30.5 (9/12,0/5)	30.5 (5/12,0/5)	30.5	—	—	—	—	—
29	—	—	29 (1/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—
28	—	28 (1/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—	—
27	—	—	27 (1/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—
23	—	23 (6/12,0/5)	—	—	23	—	—	—	—	—
20.5	—	20.5 (4/12,1/5)	20.5 (11/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—
20	—	—	20 (3/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—
19.5	—	19.5 (12/12,4/5)	19.5 (7/12,0/5)	—	19.5	—	—	—	19.5 (11/11,4/5)	—
18.5	18.5 (5/12,2/5)	—	18.5 (2/12,0/5)	18.5 (10/12,0/5)	18.5	—	—	—	18.5 (9/11,4/5)	—
17.5	—	17.5 (4/12,0/5)	17.5 (4/12,0/5)	—	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	16 (8/11,5/5)	16 (6/12,0/5)	—	—	—
Total no.	8	12	16	5	7	8	7	4	4	3

SGE – extrakt ze slinných žláz;

*Počet jedinců alergických na komáry s IgE odpovědí na antigeny ze slin/ počet jedinců alergických na komáry, počet jedinců nealergických na komáry s IgE odpovědí na antigeny ze slin/ počet nealergických jedinců

Obr. č. 2: Molekulová hmotnost slinných alergenů u 10 druhů komárů a jejich reakce s IgE protilátkami jedinců alergických i nealergických na komáří pobodání (převzato a upraveno z Peng *et al.*, 1998).

Složky slin jako ukazatelé expozice komárům

Antigenní složky slin se dají využít i jako potenciální ukazatelé expozice danému druhu komárů. Na základě naměřené hladiny protilátek proti slinným proteinům se pak dají výsledky interpretovat jako míra expozice komárům. Pro rod *Aedes* se podle posledních studií za ideální ukazatel považují IgG proti peptidu Nterm-34kDa (získaný ze slinného proteinu o velikosti 34 kDa) (Elanga Ndille *et al.*, 2012, Elanga Ndille *et al.*, 2016). Specifické IgG proti antigennímu peptidu gSG6-P1 (získaného ze slinného proteinu SG6), se ukázaly jako dobrý indikátor pro měření expozice hlavním přenašečům malárie v Africe, kterými jsou druhy *An. gambiae* a *An. funestus* (Lombardo *et al.*, 2009, Poinsignon *et al.*, 2009). Pro diagnostiku alergie na komáří pobodání se dají potenciálně využít také specifické protilátky proti výše uvedeným alergenům *Ae. aegypti* Aed a 1, Aed a 2 a Aed a 3. Přibližně 65 % lidí alergických na komáry bylo seropozitivních na rekombinantní varianty těchto proteinů (Cantillo *et al.*, 2014).

2.2 Buněčná a cytokinová odpověď na sliny komárů

Většina dosavadních studií zaměřených na buněčnou a cytokinovou odpověď na komáří sliny byla provedena na myších (Billingsley *et al.*, 2006, Hopp a Sinnis, 2015). Podle dostupných informací, se studie na lidech zaměřují především na protilátkovou imunitní odpověď a s ní související alergické reakce, nebo jsou naopak zaměřeny pouze na buněčnou imunitní odpověď vůči přenášeným patogenům (Hopp a Sinnis., 2015). Buněčná imunitní odpověď lidí proti slinám komárů je studována jen okrajově a dostupné studie jsou velmi různorodé; zabývají se vlivem slin komárů na leukocyty z periferní krve (PBMC) (Liu *et al.*, 2012, Vogt *et al.*, 2018), na dendritické buňky (Ader *et al.*, 2004) a na mastocyty (Demeure *et al.*, 2005).

V pokusu, kdy byly lidské PBMC inkubovány s komářími slinami *Ae. aegypti*, byl detekován zvýšený počet NKT buněk oproti kontrole (Vogt *et al.*, 2018). U zkoumaných PBMC sliny *Ae. aegypti* také snížily hladiny různých cytokinů, z nichž nejvýznamnější pokles byl u chemokinu RANTES (CCL5) a IP-10 (CXCL10) (Vogt *et al.*, 2018). Vliv slin komára *Ae. aegypti* byl studován i u lidských dendritických buněk derivovaných z monocytů, kde způsobil zvýšenou produkci cytokinu IL-12p70 (Ader *et al.*, 2004).

V případě použití PBMC zdravých jedinců (nebyly uvedeny bližší informace), vedlo přidání SG *Armigere subalbatus* k indukci apoptózy, přičemž nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly mezi mírou apoptózy u lymfocytů (CD3⁺) a monocytů (CD14⁺) (Liu *et al.*, 2012).

Vliv slin komárů na lidské leukocyty byl studován i u lidské linie mastocytů LAD-2, původem z leukemických pacientů. Sání komárů *An. stephensii* vyvolalo jejich degranulaci (Demeure *et al.*, 2005).

Buněčná imunitní odpověď proti slinám komárů je v několika případech popsána u hypersenzitivní reakce na komáří pobodání (HMB). Jedná se o onemocnění, které se kromě lokální kožní reakce projevuje i systémovou odpovědí a je asociované s chronickou nákazou virem Epstein-Barrové a lymfocytózou NK buněk. Systémová reakce se projevuje mimo jiné vysokými horečkami, zduřením lymfatických uzlin, zvětšením jater a sleziny a disfunkcí jater. U těchto případů byla prokázána masivní infiltrace CD4⁺ T buněk do místa pobodání a tyto buňky vykazovaly zvýšenou míru proliferace a produkci IL-4 v reakci na SG *Ae. albopictus* (Asada *et al.*, 2005, Asada, 2007). Biopsie pacientovy tkáně odhalila také zvýšené množství polymorfonukleárních buněk v místě sání (Tokura *et al.*, 1990).

Složky slin komárů ovlivňující imunitní odpověď

Ve slinách komárů byly identifikovány také konkrétní proteiny, které se účastní sání krve a ovlivňují hemostázi a zánětlivou a imunitní odpověď hostitele (Ribeiro a Francischetti, 2002). Jedná se například o enzym adenosin deaminázu (ADA), jejíž aktivita může mít za následek potlačení svědivé reakce v místě bodnutí (Ribeiro *et al.*, 2001, Ribeiro *et al.*, 2010a). Dále byla ve slinách komárů identifikována také apyráza, která je schopna hydrolyzovat ATP a ADP, což jsou molekuly spojené se zánětlivou odpovědí a také jsou zásadní pro hemokoagulaci (Sun *et al.*, 2006, Faas *et al.*, 2017). Své zastoupení má ve slinách komárů i D7 multigenová rodina proteinů, která se řadí pod superrodinu odorant binding proteinů (OBP), rozšířenou napříč celou skupinou krevsajících hmyzu z podřádu Nematocera (Peng a Simons, 2004a). U komárů jsou proteiny D7 schopné vázat a blokovat molekuly spojené v těle hostitele se zánětem a hemostatickými procesy (Calvo *et al.*, 2009).

Nedávno bylo ve slinách komárů rodu *An. coluzzi* nalezeno množství extracelulární microRNA (miRNA), která má v hostiteli potenciální imunomodulační účinky. Molekuly miRNA jsou krátké nekódující regulační jednotky RNA, které mohou ovlivnit expresi mRNA (Bartel, 2018, Arca *et al.*, 2019). Autoři studie se tak domnívají, že komáří exosomální miRNA obsažená v jejich slinách může ovlivňovat lidské imunitní buňky (Arca *et al.*, 2019).

3. Psychodidae

Čeď flebotomové (Psychodidae) v sobě zahrnuje více než 1000 druhů, rozšířených především v tropech a subtropích. Jejich výskyt byl nicméně zaznamenán už i v Kanadě, Mongolsku nebo severní Francii. Mezi pro člověka medicínsky významné zástupce patří rod *Phlebotomus* ze Starého světa a rod *Lutzomyia* z Nového světa. Samci i samice se živí cukernými šťávami, ale samice potřebují pro vývoj vajíček ve většině případů nasát krev. Samice některých druhů sají i na lidech a jsou pro člověka nebezpeční hlavně z toho důvodu, že patří mezi přenašeče parazitů leishmanií, způsobující onemocnění leishmaniózu, dále rod *Lutzomyia* přenáší bakterie způsobující nemoc Bartonellózu a také patří mezi přenašeče některých flavivirů (Kilic-Kendrick, 1999, Berenger a Parola, 2017).

3.1. Protilátková odpověď na sliny flebotomů

Opakované pobodání flebotomy vyvolává u lidí specifickou protilátkovou odpověď. Hlavní zastoupení v ní mají protilátky třídy IgG (Rohousova *et al.*, 2005, Marzouki *et al.*, 2011) a v menší míře také IgE (Gomes *et al.*, 2002, Vinhas *et al.*, 2007). Výsledky několika experimentů ukázaly odlišnou míru zastoupení konkrétních podtříd protilátek po pobodání flebotomy a může se tak jednat o druhově specifickou odpověď (Lestinova *et al.*, 2017). Vinhas *et al.* (2007) naměřili po opakovaném pobodání

dobrovolníků flebotomy *Lutzomyia longipalpis* nejvyšší podíl protilátek podtřídy IgG1, následované minoritně zastoupenými IgG2 a IgG4. Hladina specifických anti-slenných IgE byla v tomto pokusu zjištěna jen u části testovaných jedinců, a to až po několikanásobném pobodání flebotomy (Vinhas *et al.*, 2007). Děti ve věku od 6 do 12 let z oblasti výskytu flebotomů *Phlebotomus papatasi* měli v sérech nejvíce zastoupeny specifické anti-slenné protilátky podtřídy IgG4 a IgG2. Hladina specifických IgG4 pozitivně korelovala s hladinami IgG2 a IgG1, ne však s hladinou IgG3. Specifická IgE protilátková odpověď se objevila také pouze u části testovaných dětí a neměla souvislost s hladinou IgG (Marzouki *et al.*, 2011). V séru lidí z oblastí výskytu *L. intermedia* byla proti slenným antigenům tohoto druhu flebotoma naměřena celkově vyšší hladina specifických anti-slenných protilátek IgG než IgE. Primární podíl tvořily izotypy IgG1 a IgG4, zatímco IgG2 a IgG3 byly naměřeny v nižších hladinách (Carvalho *et al.*, 2015).

Přítomnost specifických anti-slenných protilátek má souvislost také s klinickými projevy reakce na pobodání. Vyšší hladiny IgE byly pozorovány u jedinců s okamžitou kožní reakcí projevující se tvorbou puchýřků oproti těm, u kterých byla kožní reakce na bodnutí *L. longipalpis* opožděná a ve formě granulomů. U skupiny s granulomem byla naopak pozorována vyšší hladina specifických IgG (Vinhas *et al.*, 2007).

Hladina specifických protilátek pozitivně koreluje s mírou expozice pobodání flebotomy (Vinhas *et al.*, 2007, Clements *et al.*, 2010, Carvalho *et al.*, 2015). Clements *et al.* (2010) prokázali, že množství flebotomů *P. argentipes* a *P. papatasi* v obydlí přímo souvisí s hladinou specifických anti-slenných protilátek jejich obyvatelů. Vyšší hladina specifických protilátek byla naměřena i u lidí z oblasti výskytu *L. intermedia* pohybujících se venku za soumraku, kdy je větší výskyt flebotomů (Carvalho *et al.*, 2015).

S mírou expozice flebotomů má spojitost také kinetika protilátkové reakce. U lidí z oblasti výskytu *P. argentipes* a *P. papatasi* vedla 30-denní izolace od jejich pobodání k poklesu hladiny specifických anti-slenných IgG protilátek. Při dalším měření, 6 měsíců po skončení této izolace, hladiny specifických protilátek opět narostly, a to dokonce na vyšší hodnoty, než které byly naměřeny před začátkem izolace. Na základě těchto údajů určili autoři studie poločas rozpadu specifických IgG proti *P. argentipes* na 166 dní (Clements *et al.*, 2010). Opakované pobodání *L. longipalpis* po dobu 45 dní postupně zvyšovalo hladiny specifických protilátek IgG a IgE v séru dobrovolníků, kteří byli na začátku pokusu seronegativní na slenné antigeny *L. longipalpis* a 4 měsíce po posledním pobodání byl naměřen pokles v hladinách specifických protilátek. Po 10 měsících od posledního pobodání byly už specifické protilátky téměř na hranici měřitelnosti. Po opětovném pobodání *L. longipalpis* se jejich hladiny znovu zvýšily (Vinhas *et al.*, 2007).

Protilátková odpověď na sliny flebotomů byla studovaná také v souvislosti s přenosem leishmanií. V několika případech byla prokázána zvýšená produkce specifických anti-slinných protilátek u osob s pozitivním protilátkovým či kožním testem na leishmaniózu (Barral *et al.*, 2000, Gomes *et al.*, 2002, de Moura *et al.*, 2007, Rohousova *et al.*, 2005, Clements *et al.*, 2010, Carvalho *et al.*, 2015).

V případě viscerální leishmaniózy (VL) pozorovali Barral *et al.*, (2000) a Gomes *et al.*, (2002) zvýšené hladiny specifických protilátek IgG proti SG flebotomů, v případě, že se jednalo o jedince s pozitivní DTH reakcí na *Le. chagasi*. U dětí ve věku do 7 let měla hladina specifických IgG protilátek na antigeny z SG *L. longipalpis* přímou souvislost s intenzitou DTH reakce na antigeny z *Le. chagasi* (Barral *et al.*, 2000). Ke stejným závěrům došli i Gomes *et al.*, (2002) také u skupiny dětí ve věku do 7 let z endemických oblastí výskytu flebotomů *L. longipalpis* a leishmanií *Le. chagasi*. Pokud se DTH reakce této skupiny na *Le. chagasi* v průběhu sledovaného 6-měsíčního období změnila z negativní na pozitivní, byla u nich následně naměřena výrazně zvýšená hladina protilátek IgG1 proti slinným antigenům *L. longipalpis* (další podtřídy IgG nebyly ovlivněny) a v menší míře i IgE oproti počátku měření. V případě dětí, u nichž v tomto období došlo pouze k serokonverzi z negativní na pozitivní na antigeny *Le. chagasi*, byl zaznamenán naopak pokles specifických anti-*L. longipalpis* IgG, nicméně hladina protilátek IgG4 mírně narostla a v hladinách IgE nebyly zaznamenány žádné rozdíly (Gomes *et al.* 2002). Hladina specifických protilátek IgG proti *P. argentipes* byla zvýšená také v endemické oblasti VL v Indii, kterou má v této oblasti na svědomí *Le. donovani* (Clements *et al.*, 2010).

Hladina specifických protilátek IgG proti antigenům z SG flebotomů byla vyšší také u lidí z oblastí endemického výskytu kutánní leishmaniózy (CL) (Rohousova *et al.*, 2005, de Moura *et al.*, 2007, Carvalho *et al.*, 2015). Zvýšené hladiny specifických IgG protilátek proti SG *L. intermedia*, byly zaznamenány v sérech lidí z endemického výskytu CL, působené *Le. braziliensis* (de Moura *et al.*, 2007, Carvalho *et al.*, 2015). Také Rohousova *et al.* (2005) pozorovali vyšší hladinu specifických IgG protilátek proti slinným antigenům *P. sergenti* u pacientů s pozitivním kožním testem na *Le. tropica*, přičemž se autoři studie domnívají, že tento efekt pravděpodobně souvisí s vyšší mírou expozice danému druhu flebotomů, a tím pádem i zvýšenému riziku kontaktu s leishmaniemi (Rohousova *et al.*, 2005). Stejně tak byly naměřeny zvýšené specifické anti-*L. intermedia* SG protilátky IgG u lidí z endemické oblasti CL působené *Le. braziliensis*. Tyto protilátky byly zároveň vyšší u lidí s rozvinutou CL, oproti zdravým lidem, kteří ale měli pozitivní DTH kožní test na leishmanie (de Moura *et al.*, 2007).

Pomocí analýzy sér lidí pobodaných flebotomy, byly identifikovány konkrétní antigenní molekuly ve slinách flebotomů. V případě antigenů z SG *L. longipalpis* reagovaly specifické protilátky v sérech s některými proteiny o určitých molekulových hmotnostech. Co se týče afinity těchto protilátek k molekulám, byly výsledky velmi individuální. Séra z dobrovolníků, kteří měli pozitivní reakci na antigeny *L. longipalpis*, reagovala s proteiny o velikostech 45, 44, 43, 35 a 17 kDa z SG *L. longipalpis* (Gomes *et al.*, 2002, Vinhas *et al.*, 2007). Při opakovaném vystavení pobodání flebotomy měl 60. den

s protilátkami nejintenzivnější reakci protein o velikosti 45 kDa (Vinhas *et al.*, 2007). U skupiny dětí do 7 let však IgG protilátky nejintenzivněji reagovaly s proteiny z SG *L. longipalpis* o molekulové hmotnosti 6, 12, 36 a 96 kDa (Barral *et al.*, 2000). Také při dalším experimentu protilátky v sérech lidí z oblasti výskytu *L. longipalpis* rozpoznaly proteiny primárně v rozmezí od 15 do 65 kDa. Jako 2 hlavní imunogenní proteiny z SG *L. longipalpis* byly identifikovány LJM11 (43 kDa yellow-related protein) a LJM17 (45 kDa yellow-related protein), jejichž rekombinantní formy se ukázaly jako vhodné ukazatele expozice těmto druhům flebotomům (Teixeira *et al.*, 2010, Souza *et al.*, 2010). Zároveň sérum těchto lidí reagovalo s proteiny v rozmezí 28 a 50 kDa z SG *L. verrucanum* a s proteinem o velikosti 40 kDa z SG *P. perniciosus*. Ani jeden z těchto druhů nepochází ze zkoumané oblasti a pravděpodobně se tak jedná o nespecifickou zkříženou reakci mezi těmito druhy. Zkřížená reaktivita s proteiny z SG *L. intermedia* byla minimální (Teixeira *et al.*, 2010).

Carvalho *et al.* (2015) sledovali imunogenní proteiny v SG *L. intermedia*, kdy specifické protilátky v sérech dobrovolníků reagovaly s proteiny o velikosti přibližně 52, 38 a 30 kDa, což poukazuje na členy rodiny yellow related proteins, apyrázu a proteiny z rodiny proteinů o velikosti 33 kDa.

V případě proteinů z SG *P. papatasi* reagujících se specifickými protilátkami zkoumaných dobrovolníků byla provedena důkladnější analýza některých konkrétních látek. U dětí ve věku od 6 do 12 let reagovaly jejich protilátky v séru ve všech případech s molekulou z SG *P. papatasi* o velikosti 30 kDa, zatímco ostatní proteiny byly v různých sérech rozeznávány s odlišnou intenzitou. Další proteiny rozpoznané sérem byly v téměř všech případech měl velikost 12, 15 a 36 kDa a v menším počtu případů i 21, 28 a 44 kDa proteiny. Až na protein o velikosti 21 kDa odpovídaly nalezené molekuly již dříve popsáným a určeným slinným proteinům *P. papatasi* – SL1 protein (PpSP12, PpSP15), D7 proteiny (PpSP28, PpSP30), slinná apyráza (PpSP36) a yellow protein (PpSP42) (Marzouki *et al.*, 2011). Reaktivita proteinů s jednotlivými protilátkami je shrnuta v tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Reaktivita proteinů SG *P. papatasi* s protilátkami v sérech dětí ve věku od 6 do 12 let, žijících v oblasti s výskytem *P. papatasi* (shrnutí podle Marzouki *et al.*, 2011).

Protilátky	IgE	IgG	IgG1	IgG2	IgG4
Proteiny	21 kDa; PpSP30; PpSP28	PpSP30; PpSP28	PpSP12; PpSP15; PpSP36	PpSP12; PpSP15; PpSP36	PpSP15; PpSP36

Ve slinách *P. papatasi* byl hlavním rozpoznávaným proteinem také SP32 (patřící do rodiny proteinů o velikosti 30 kDa), jehož rekombinantní forma se ukázala jako dobrý ukazatel expozici danému druhu flebotomů (Marzouki *et al.*, 2012, Marzouki *et al.*, 2015).

V případě antigenů ze slin *P. orientalis* byly v séru lidí žijících v oblasti jejich výskytu specifickými protilátkami IgG s nejvyšší intenzitou rozpoznány proteiny o velikosti 40 a 28 kDa, což

odpovídá proteinům z rodiny yellow-related proteins a antigen-5' related proteins. Ukázalo se, že kombinace těchto 2 proteinů z SG *P. orientalis* - yellow related protein mYELI a antigen-5' related protein mAG5, může sloužit jako ukazatel expozice těmto flebotomům (Sumova *et al.*, 2018).

3.2 Buněčná a cytokinová odpověď na sliny flebotomů

Účinek slin flebotomů na buněčnou a cytokinovou složku imunitního systému byl prokázáný především na myších modelech (Abdelahim *et al.*, 2014, Lestínová *et al.*, 2017) a také při několika málo pokusech s lidskými buňkami (Abdeladhim *et al.*, 2011, Mukbel *et al.*, 2016, Pushpanjali *et al.*, 2016, Kammoun-Rebai *et al.*, 2017). V následujících odstavcích je uveden souhrn lidské buněčné a cytokinové imunitní odpovědi na sliny flebotomů, a to jak u zástupců flebotomů z Nového, tak i ze Starého světa.

3.2.1 Vliv slin flebotomů na proliferaci lidských PBMC

Lidé, žijící v oblastech výskytu *P. papatasi* mají zvýšenou proliferační odpověď PBMC na antigeny slinných žláz *P. papatasi* (Abdeladhim *et al.*, 2011, Mukbel *et al.*, 2016, Kammoun-Rebai *et al.*, 2017).

Zvýšení proliferace PBMC po jejich inkubaci s SG *P. papatasi* bylo pozorováno přibližně u 1/3 testovaných buněk pocházejících od dobrovolníků z Tuniska (Kammoun-Rebai *et al.*, 2017, Abdeladhim *et al.*, 2011). V případě experimentu Abdeladhim *et al.* (2011) byla vyšší proliferace pozorovaná u CD4⁺ i CD8⁺ buněk.

Podobné výsledky byly zaznamenány i při testování PBMC od opakovaně pobodaných dárců z Jordánska, oblasti výskytu *P. papatasi*. Odebrané PBMC byly inkubovány s SG *P. papatasi*, přičemž lidé z oblasti výskytu tohoto flebotoma měli vyšší hodnoty proliferace těchto buněk oproti kontrolní skupině (Mukbel *et al.*, 2016).

Také sliny *L. longipalpis* mají vliv na počty konkrétních lymfocytů v krvi. Opakované pobodání dobrovolníků flebotomy *L. longipalpis* a následná inkubace jejich PBMC s SG *L. longipalpis*, vyvolala zvýšení počtu Treg lymfocytů CD25⁺CD4⁺ a CD25⁺CD8⁺ (Vinhas *et al.*, 2007).

3.2.2 DTH reakce na pobodání flebotomy

V rámci testování buněčné imunitní odpovědi na pobodání flebotomy byla v některých případech popsána i opožděná forma hypersenzitivní reakce (DTH). Ta má projevy svědivé reakce, otoku, tvorby granulomu v místě bodnutí a zčervenání pokožky s odstupem 1-2 dnů po kontaktu s flebotomem (Belkaid *et al.*, 2000, Vinhas *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2013). V místě jednorázového sání *P. duboscqui* bylo u dobrovolníků z oblasti jejich výskytu a s projevy DTH reakcí detekováno zvýšené množství T-lymfocytů (CD3⁺CD20⁻) a v menší míře i makrofágů, přičemž přítomnost neutrofilů a eozinofilů nebyla potvrzena. V místě bodnutí byla také naměřena nízká hladina cytokinů IL-13, IL-5, TGF-β a TNF-β a zároveň cytokiny IL-12 a IL-4 nebyly přítomny vůbec. Ke zvýšení hladiny došlo pouze

u IFN- γ a autoři studie tak předpokládají, že se jedná o imunitní odpověď Th1 typu (Oliveira *et al.*, 2013). V případě osob, u kterých se již v minulosti projevila DTH, byl při následném pobodání flebotomy *P. papatasi* pozorován zvýšený průtok krve v místě sání, což významně napomáhá flebotomům při získávání krve (Belkaid *et al.*, 2000).

U stejné testované skupiny dobrovolníků, které zkoumali Oliveira *et al.* (2013), měl také počet případů DTH se zvyšujícím se věkem negativní tendenci. Děti do 2 let vykazovaly DTH reakci v 95 % případů, zatímco u dospělých ve věku 35-45 let už DTH projevilo pouze u 48 % testovaných jedinců (Oliveira *et al.*, 2013).

3.2.3 Vliv slin flebotomů na expresi kostimulačních molekul imunitních buněk

Dalším z faktorů imunitní odpovědi ovlivněným složkami ze slinných žláz flebotomů, je změna v expresi kostimulačních molekul některých bílých krvinek (Costa *et al.*, 2004, Menezes *et al.*, 2008). Kostimulační molekuly hrají významnou roli při aktivaci, udržování a také určování směru T buněčné odpovědi (Chen a Flies, 2013).

U lidských monocytů a makrofágů stimulovaných pomocí LPS, získaných z Brazílské krevní banky (bez uvedení předchozí expozice flebotomům), vyvolalo SG *L. longipalpis* snížení exprese povrchového CD80 a zvýšení HLA-DR. U monocytů pak byla zároveň zvýšená exprese kostimulační molekuly CD86 (Costa *et al.*, 2004). K částečně odlišným výsledkům při zkoumání tohoto jevu došli Menezes *et al.* (2008) u lidských monocytů také získaných z Brazílské krevní banky (bez uvedení předchozí expozice flebotomům), když v experimentu použil SG *L. intermedia*. Tyto buňky vykazovaly vyšší počty kostimulačních molekul CD80, CD86 a HLA-DR, pokud byly stimulované pomocí LPS a inkubované s SG *L. intermedia*. Autoři studie se také domnívají, že zvýšení exprese těchto konkrétních kostimulačních molekul (CD80, CD86 a HLA-DR) může být důsledkem snížené hladiny cytokinu IL-10, u kterého bylo prokázáno, že reguluje expresi HLA-DR a CD86 v dendritických buňkách periferní krve (Buelens *et al.*, 1995 a Menezes *et al.*, 2008).

Také kostimulační molekuly dendritických buněk (DC), které jsou zásadní pro rozvoj imunitní odpovědi, byly ovlivněny přítomností SG *L. longipalpis* v jejich kultuře. Pokud bylo SG přidáno v průběhu jejich generace z lidských PBMC, došlo u nich ke snížení exprese CD80, CD86, HLA-DR a CD1a. Na maturaci DC stimulovaných LPS nemělo SG *L. longipalpis* žádný prokazatelný účinek. Pokud však bylo na místo LPS pro stimulaci použit CD40L, přidání SG snížilo expresi CD80, CD86 a HLA-DR (Costa *et al.*, 2004). Pro větší přehlednost jsou výsledky měření uvedeny v tabulce č. 2.

Tab. č. 2: Expres kostimulačních molekul u buněk stimulovaných LPS po přidání SG *L. longipalpis* nebo *L. intermedia*. Prázdná pole (-) označují neměřené pokusy. Shrnutí podle Menezes *et al.*, (2008), Costa *et al.*, (2004).

	<i>L. longipalpis</i>			<i>L. intermedia</i>		
	CD80	CD86	HLA-DR	CD80	CD86	HLA-DR
Monocyty						
Makrofágy				-	-	-
Generace DC				-	-	-
Maturace DC				-	-	-

Vysvětlivky	snížení	zvýšení	beze změny
-------------	---------	---------	------------

3.2.4 Vliv slin flebotomů rodu *Phlebotomus* na produkci cytokinů

Produkce cytokinů je u lidských buněk ovlivněná přítomností SG flebotomů, přičemž ale výsledky studií nejsou jednotné a v některých případech se liší i v rámci stejného druhu.

Abdeladhim *et al.* (2011) zkoumali změny v hladinách cytokinů produkovaných lidskými PBMC po inkubaci s SG *P. papatasi*, přičemž se jednalo o buňky dobrovolníků žijících v Tunisku v ohnisku *Le. major*. Ke zvýšení hladiny oproti kontrole došlo u cytokinů IL-4 a IL-10, ale pouze v případě, že se jednalo o buňky, které vykazovaly také zvýšenou proliferační odpověď v reakci na SG. Cytokin IL-10 byl produkovaný primárně CD3⁺CD8⁺ T lymfocyty a CD3⁻ buňkami (podle autorů pravděpodobně B-lymfocyty), zatímco cytokin IL-4 pouze CD3⁺CD8⁺ T buňkami. Dalšími experimenty bylo prokázáno, že IL-10 produkovaný CD3⁺CD8⁺ T buňkami také následně inhibuje jejich proliferaci a zároveň proliferaci CD4⁺ buněk. Ve výsledku tak SG navozuje aktivaci CD3⁺CD8⁺ T lymfocytů Th2 typu a také odpověď Th1 polarizovaných CD4⁺ buněk, které jsou ale pravděpodobně potlačeny cytokinem IL-10 produkovaným CD3⁺CD8⁺ T buňkami (Abdeladhim *et al.*, 2011). Za stejných podmínek byla měřena i hladina IFN- γ , která nebyla nijak signifikantně změněna oproti kontrole a inkubace buněk s SG neovlivnila ani produkci TNF- α . Tyto výsledky mimo jiné podporují teorii autorů studie, že aktivované CD8⁺ buňky jsou Th2 typu (Abdeladhim *et al.*, 2011).

Produkce cytokinů byla sledována u lidí žijících v oblasti výskytu *P. papatasi* a *Le. major* v Tunisku i v dalším experimentu (Kammoun-Rebaie *et al.*, 2017). Výsledky jsou ale v rozporu s předchozími pokusy podle Abdeladhim *et al.* (2011), jelikož u PBMC z testovaných jedinců naměřili po aplikaci SG zvýšenou hladinu IFN- γ a naopak hladina cytokinu IL-10 nebyla nijak signifikantně ovlivněna, a to bez ohledu na to, zda se jednalo o jedince s asymptomatickou infekcí, zdravé jedince nebo osoby vyléčené. Dalších 17 testovaných cytokinů a chemokinů nebylo po aplikaci SG detekované ve významných hladinách. Kromě zvýšené proliferace PBMC v reakci na SG měla zvýšená hladina IFN- γ ještě pozitivní korelaci se specifickými protilátkami IgG, pouze však v oblasti nově vznikajícího ohniska leishmaniózy (Kammoun-Rebaie *et al.*, 2017).

Hladina IFN- γ byla minimálně snížena v případě inkubace SG *P. argentipes* s lidskými PBMC, kdy zároveň došlo k významnému nárůstu produkce cytokinu IL-10 CD4⁺ buňkami. Z této studie nelze jasně určit, zda se dárce před darováním buněk již setkali s flebotomy, nicméně pravděpodobně pocházeli z oblasti rozšíření *P. argentipes* (Pushpanjali *et al.*, 2016).

Systémovou odpověď imunitního systému při jednorázovém pobodání flebotomy *P. duboscqui* potvrdila analýza lidských PBMC stimulovaných pomocí SG *P. duboscqui* od dárců z oblasti jejich výskytu. Směr T buněčné odpovědi byl individuální a dokonce přibližně 50 % z testovaných osob jevílo kombinovanou Th1/Th2 odpověď. Th1 odpověď byla detekovaná přibližně u čtvrtiny dobrovolníků, a to na základě zvýšené hladiny cytokinů IFN- γ a snížené hladiny IL-13 a IL-5. U zbylé čtvrtiny naopak zvýšené hladiny IL-13 a IL-5 a zároveň nízké hladiny IFN- γ svědčily o směru Th2. Různorodost odpovědi těchto PBMC mohla souviset s předchozím infikováním testovaných lidí *Le. major*, které ale v tomto případě autoři studie neměli možnost ověřit (Oliveira *et al.*, 2013). Nicméně Kammoun-Rebai *et al.* (2017) stejně jako Abdelahim *et al.* (2011) uvádí, že zvýšená proliferační odpověď na SG flebotomů (v případě *P. argentipes* a *P. papatasi*) nijak nesouvisí s předchozí nákazou leishmaniemi.

3.2.5 Vliv slin flebotomů rodu *Lutzomyia* na produkci cytokinů

Důsledky přímého pobodání samicemi rodu *Lutzomyia* na cytokinovou produkci zkoumali na lidských PBMC Costa *et al.* (2004), Vinhas *et al.* (2007) a Carvalho *et al.*, (2015). V případě, kdy byli dobrovolníci opakovaně pobodáni flebotomy *L. longipalpis*, tak odebrané PBMC vykazovaly po inkubaci s SG *L. longipalpis* zvýšenou produkci cytokinů IFN- γ a IL-10, přičemž hladina TNF- α nebyla oproti kontrole pozměněna. Po jednom roce od posledního pobodání, kdy byli dobrovolníci opět vystaveni sání, u nich byla zaznamenána vyšší hladina cytokinu IFN- γ oproti kontrole (Vinhas *et al.* 2007). Také PBMC z dobrovolníku seropozitivních na antigeny z SG *L. intermedia* měly po inkubaci s SG tohoto flebotoma zvýšenou produkci cytokinů IFN- γ , IL-10 a IL-13, kdy se zároveň hladina TNF od kontrolní skupiny nijak nelišila. Dominantní zde bylo zvýšení hladiny IL-10, který byl produkovaný CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ T buňkami. Také chemokiny CCL-5 a CXCL-9 měly zvýšené hladiny po inkubaci PBMC s SG *L. intermedia* (Carvalho *et al.*, 2015). Vyšší hladina CXCL-9 pozitivně koreluje s výsledky studií podle Weinkopff *et al.* (2014), kteří měřili expresi IFN- γ indukčních genů u PBMC buněk po jejich inkubaci s SG *L. intermedia*. Darované PBMC pro účely pokusu pocházely z jedinců, kteří měli pozitivní serologický test na antigeny z SG *L. intermedia*. Buňky v přítomnosti SG *L. intermedia* měly prokazatelně zvýšenou produkci mRNA pro proteiny Ifit, Irgm (patřící do rodiny IFN-inducibilních genů), komponentu signální kaskády Stat 1 a chemokin CXCL9, což jsou všechno molekuly spojené se zvýšenou hladinou IFN- γ při infekci (Müller *et al.*, 2010, Weinkopff *et al.*, 2014).

Pomocí ELISA testu byla odhalena i zvýšená hladina chemokinu CXCL9 oproti kontrole (Weinkopff *et al.*, 2014).

U monocytů z dobrovolníků z Brazílie, oblasti výskytu *L. longipalpis* a stimulovaných pomocí LPS a SG *L. longipalpis*, byla naměřena prokazatelně nižší produkce cytokinů TNF- α a IL-10 a naopak buňky produkovaly zvýšené hladiny cytokinů IL-6, IL-8 a IL-12p40. Tento efekt SG byl potlačen, pokud bylo ke kultuře přidáno sérum obsahující protilátky proti slinám *L. longipalpis* (Costa *et al.*, 2004). Produkce cytokinů byla ovlivněná i v případě lidských monocytů inkubovaných s SG *L. intermedia*, ovšem s odlišnými výsledky oproti studii podle Costa *et al.* (2004). Inkubace monocytů dobrovolníků z Brazílské krevní banky v oblasti rozšíření těchto flebotomů (bez uvedení jejich přechozímu kontaktu s nimi) s SG *L. intermedia* a následná stimulace pomocí LPS vedla také ke snížené produkci IL-10, přičemž ale hladina TNF- α , IL-6 a IL-12p40 nebyla nijak signifikantně ovlivněna (Menezes *et al.*, 2008).

Jednou ze složek slin flebotomů, která má vliv na produkci cytokinů u lidských imunitních buněk, je maxadilan. Jedná se o peptid s vasodilatačním účinkem, který byl nalezený pouze u flebotomů rodu *Lutzomyia* (Lerner *et al.*, 1991). U monocytů stimulovaných pomocí LPS inhibovalo přidání maxadilanu produkci TNF- α a zároveň vedlo k produkci IL-6 (Rogers a Titus, 2003). Maxadilan působí také jako chemoatraktant lidských neutrofilů a ovlivňuje tak jejich migraci (Svensjö *et al.*, 2013).

4. Simuliidae

Muchničky (Simuliidae) jsou celosvětově rozšíření krevsající členovci, kteří zahrnují více než 2300 druhů (Currie a Adler, 2008). Přibližně 10 % z nich se živí i na člověku, ale žádný z popsaných druhů není striktně antropofilní (Adler a McCreadie, 2019). Larvy muchniček, jakožto pasivní filtrátoři, vyžadují čisté tekoucí vody a jsou významnou součástí potravního řetězce (Ciadamidaro *et al.*, 2016).

Až u 98 % druhů z této čeledi se samice v dospělosti živí kromě rostlinných cukrů i krví savců a ptáků, která jim dodává potřebné látky pro vývoj oocytů (Noriega *et al.*, 2002). Bodnutí a sání krve může způsobovat různé hypersenzitivní a alergické reakce hostitele. Muchničky také patří k významným vektorům některých patogenů (Schaffartzik *et al.*, 2009). Pro člověka nejvýznamnějším přenášeným parazitem jsou filárie *Onchocerca volvulus* (Chagas *et al.*, 2011), které způsobují tzv. říční slepotu. Z veterinárního hlediska jsou významným přenašečem viru vezikulární stomatitidy, který napadá skot (Tabachnick, 2010). Nebezpečí však představuje i samotné pobodání muchničkami bez přenosu patogena, které může u hospodářských zvířat vyvolat toxický šok (simuliotoxikózu) (Currie a Adler, 2008).

Dle dostupných informací byly antigenní a imunomodulační vlastnosti slinných žláz muchniček doposud studovány především na myších modelech (Cross *et al.*, 1993a, Cross *et al.*, 1993b Cross *et al.*, 1994, Tsujimoto *et al.*, 2010, Chattopadhyay *et al.*, 2013). Imunitní odpověď člověka na sliny muchniček nebyla podle nalezených zdrojů přímo experimentálně testována. Klinicky však bylo popsáno několik případů vycházejících z hypersenzitivních reakcí na pobodání muchniček, které se označují jako simulioza (Chiriac *et al.*, 2016). Reakce na slinné antigeny muchniček se projevuje především v podobě lokálního zánětu, puchýřů, otoků a kožních lézí, může však dojít i k systémové reakci až k anafylaktickému šoku (Borah *et al.*, 2012, Chattopadhyay *et al.*, 2013). U pacientky se simuliozou byla v biopsii kůže po pobodání muchničkami prokázána infiltrace lymfocytů a eozinofilů v místě sání (Borah *et al.*, 2012). Stejně histopatologické nálezy – zvýšený počet lymfocytů a eozinofilů v místě bodnutí, byly zaznamenány i v několika dalších případech, u pobodaných lidí pobodaných lidí v Japonsku (Gudgel a Grauel, 1954).

Konkrétní látky s potenciálními imunomodulačními účinky nebyly ve slinách muchniček doposud určeny, nicméně sekvence některých u nich nalezených proteinů jsou známy pro tyto vlastnosti i z jiných zástupců krevsajícího hmyzu. Jedná se například o enzymy serinovou proteázu, apyrázu a adenosin deaminázu, protein Aegyptin, krátké verze D7 proteinů a rodinu 30 kDa proteinů (Andersen *et al.*, 2009, Ribeiro *et al.*, 2010a, Ribeiro *et al.*, 2010b, Chagas *et al.*, 2011).

5. Ceratopogonidae

Tiplíci (Ceratopogonidae) jsou bohatě zastoupená rodina řádu Diptera (Nematocera), která má téměř kosmopolitní rozšíření s výjimkou Antarktidy. Řadí se sem přibližně 6300 druhů, kteří se nacházejí téměř ve všech biomech. Jejich vajíčka a larvy vyžadují většinou vlhké prostředí a samice zároveň v některých případech potřebují krev pro vývoj vajíček. Krev sají především na ptácích a savcích a mohou napadat i člověka. Na člověku sají samice 4 rodů, a to konkrétně *Culicoides*, *Leptoconops*, *Forcipomyia* (podřád *Lasiohelea*) a *Austroconops*. Z lékařského hlediska mohou být pro člověka významní jako přenašeči některých patogenů, mezi které patří filárie rodu *Mansonella*, způsobující onemocnění mansolleniózu, a také virus Oropouche. Ten způsobuje několikadenní horečky, s typickými bolestmi svalů. Jsou významnými přenašeči také mnoha parazitů veterinárního významu, kam patří např. *Haemoproteus*, *Hepaticystis* a *Leucocytozoon* a více než 50 arbovirů z několika různých rodin (Buyaviridae, Reoviridae a Rhabdoviridae) (Mellor *et al.*, 2000, Ronderos *et al.*, 2018, Mullen a Murphree, 2019).

Podle dohledatelných zdrojů nebyl vliv slin tiplíků na imunitní systém člověka doposud experimentálně testován a nejsou dostupné ani histologické či protilátkové analýzy. Imunitní odpověď člověka na tiplíky byla sledovaná ve dvou studiích, kde byl použit extrakty z celých těl (WBE) tiplíků

Forcipomyia taiwana a jejich výsledky se tak nacházejí mimo zaměření této bakalářské práce (Chen *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2009). Po aplikaci WBE do kůže testovaných dobrovolníků nicméně pozorovali dvě formy kožní reakce, a to okamžitou a opožděnou kožní reakci. Okamžitá kožní reakce byla u alergických jedinců doprovázena zvýšením hladiny specifických anti-WBE IgE protilátek (Chen *et al.*, 2005). Další experimenty prokázali účinek WBE *F. taiwana* i na buněčnou a cytokinovou formu imunitní odpovědi, kdy po aplikaci WBE byla zvýšená proliferace PBMC buněk a také zvýšená hladina cytokinů IFN- γ , IL-10, IL-6 and TNF- α u lidí s opožděnou formou kožní reakce (Chen *et al.*, 2009).

Existuje také několik studií, které se zabývají imunitní odpovědí na sliny a slinné žlázy na myších modelech a napomáhají tak porozumění možné imunitní odpovědi u člověka. Konkrétně jsou to například studie s *Culicoides sonorensis* na myších kmene Balb/c (Lehiy *et al.*, 2018) a s C57BL/6 (Bishop *et al.*, 2006). V souvislosti s imunitní reakcí na pobodání tiplíky je také dobře známá hypersenzitivní reakce u koní (IBH), která se projevuje jako svědivá reakce s tvorbou pupínků a může vést k lokálním ztrátám srsti. Jako alergeny odpovědné za tuto reakci byly popsány některé látky ze slinných žláz tiplíků, které jsou homologní k látkám vyvolávající alergické reakce i u člověka (Schaffartzik *et al.*, 2012). Konkrétně se jedná o Cul n 1 a Sim v 1 (homology s rodinou antigen 5 proteinů) (Schaffartzik *et al.*, 2010), Cul n 2 (homolog s hyaluronidázou) (Markovic-Housley *et al.*, 2000), Cul n 9 (homolog proteinů rodiny D7) (Malafronte Rdos *et al.*, 2003) a maltázy Cul s 1 a Cul n 8 (Horner *et al.*, 2008).

6. Závěr

Předložená bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky získané studiem imunitní odpovědi člověka na sliny krevsajících hmyzu z podřádu Nematocera. Převážná část dostupných studií je zaměřena na čeledi Culicidae a Psychodidae, zatímco lidská imunitní odpověď na sliny Simuliidae a Ceratopogonidae byla doposud zkoumána pouze minoritně.

Opakované pobodání flebotomy i komáry vytváří u lidí specifickou IgG a IgE protilátkovou odpověď. V obecném měřítku má tato protilátková odpověď na pobodání komáry i flebotomy dynamický charakter, který je odrazem několika různých faktorů. Mezi hlavní faktory ovlivňující hladiny protilátek patří míra a délka expozice danému hmyzu, kdy zvýšení těchto hodnot působí nárůst hladin specifických protilátek v séru hostitele. Rychlost jejich poklesu v séru se jeví také jako druhově závislá, přičemž je ovlivněna i konkrétní třídou protilátek. Z tohoto hlediska mají v reakcích na komáří pobodání velký význam specifické protilátky typu IgE (v hypersenzitivní reakci I. typu). To má souvislost s poměrně častým výskytem alergických reakcí na komáří pobodání. Naopak u flebotomů převažuje IgG specifická protilátková odpověď (hypersenzitivní reakce III. typu), přičemž se ale zastoupení jednotlivých podtříd IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) ukazuje jako druhově specifické.

Buněčná a cytokinová odpověď na sliny komárů byla zkoumaná pouze okrajově jako doplňková část některých experimentů. Výsledky tak postrádají spojující prvek, ale jsou zaznamenány změny v hladinách cytokinů produkovaných PBMC po jejich inkubaci s SG *Ae. aegypti*, apoptóza lymfocytů vyvolaná jejich inkubací s SG *Ar. subalbanus* a degranulace mastocytů po sání *An. stephensi*. U flebotomů je dostupný o něco jednotnější pohled na odpověď buněčných a cytokinových složek lidského imunitního systému. Přidání SG flebotomů rodů *Lutzomyia* a *Phlebotomus* ke kultuře lidských PBMC od opakovaně pobodaných dárců vyvolává jejich proliferaci. Také cytokiny produkované lidskými monocyty a PBMC buňkami byly ovlivněny přítomností SG flebotomů, nicméně jednotlivé studie se ve svých závěrech rozcházejí, a to i v případě experimentů se stejnými druhy. Rozdílné výsledky se týkají i hladin cytokinů polarizujících T buněčnou odpověď Th1 nebo Th2 směrem, a tato otázka tak zatím zůstává nedořešena. U SG flebotomů *L. longipalpis* a *L. intermedia* byl navíc prokázán i vliv na expresi kostimulačních molekul CD80, CD86 a HLA-DR u monocytů, makrofágů a dendritických buněk. Ty jsou zásadní pro aktivaci T lymfocytů.

Sání muchniček vyvolalo u napadeného hostitele infiltraci eozinofilů a lymfocytů v místě bodnutí, ale další podrobnější analýza imunitní odpovědi není dostupná. Pro studium lidské imunitní odpovědi byl u tiplíků experimentálně použitý pouze extrakt z jejich těl. Vliv jejich slin přímo na složky imunitního systému člověka tak zatím zůstává neprobádaný.

Přestože studií zaměřujících se na danou problematiku existuje poměrně velké množství, mezi jednotlivými experimenty lze jen s obtížemi hledat spojující prvky a ucelený pohled na toto téma tak zatím schází. Díky studii protilátkové odpovědi se však již podařilo odhalit několik konkrétních proteinů

ze slin a slinných žláz krevsajícího hmyzu z podřádu Nematocera, které se dají v praxi použít jako ukazatele expozice daným druhům a posloužit tak např. pro epidemiologické průzkumy.

7. Seznam literatury

- Abdeladhim, M., Ahmed, M. B., Marzuki, S., Hmida, N. B., Boussoffara, T., Hamida, N. B., Salah, A. B. a Louzir, H. (2011) 'Human cellular immune response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* is mediated by IL-10-producing CD8⁺ T cells and TH1-Polarized CD4⁺ lymphocytes', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10): e1345. doi: 10.1371/journal.pntd.0001345.
- Abdeladhim, M., Kamhawi, S. a Valenzuela, J. G. (2014) 'What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity', *Infection, Genetics and Evolution*, 28: 691-703 doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.028.
- Ader, D. B., Celluzzi, C., Bisbing, J., Gilmore, L., Gunther, V., Peachman, K. K., Rao, M., Barvir, D., Sun, W. a Palmer, D. R. (2004) 'Modulation of Dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva', *Viral Immunology*, 17(2): 252–265. doi: 10.1089/0882824041310496.
- Adler, P. H. a McCreadie, J. W. (2019) 'Black Flies (Simuliidae)', *Medical and Veterinary Entomology*, 237–259. doi:10.1016/b978-0-12-814043-7.00014-5
- Andersen, J. F., Pham, V. M., Meng, Z., Champagne, D. E. a Ribeiro, J. M. C. (2009) 'Insight into the sialome of the black fly, *Simulium vittatum*', *Journal of Proteome Research*, 8(3): 1474–1488. doi: 10.1021/pr8008429.
- Arcà, B., Colantoni, A., Fiorillo, C., Severini, F., Benes, V., Di Luca, M., Calogero, R. A. a Lombardo, F. (2019) 'MicroRNAs from saliva of anopheline mosquitoes mimic human endogenous miRNAs and may contribute to vector-host-pathogen interactions', *Scientific Reports*, 9(1): 1–16. doi: 10.1038/s41598-019-39880-1.
- Asada, H., Saito-Katsuragi, M., Niizeki, H., Yoshioka, A., Suguri, S., Isonokami, M., Aoki, T., Ishihara, S., Tokura, Y., Iwatsuki, K. a Miyagawa, S. (2005) 'Mosquito salivary gland extracts induce EBV-infected NK cell oncogenesis via CD4⁺ T cells in patients with hypersensitivity to mosquito bites', *Journal of Investigative Dermatology*, 125(5): 956–961. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23915.x.
- Asada, H. (2007) 'Hypersensitivity to mosquito bites: A unique pathogenic mechanism linking Epstein-Barr virus infection, allergy and oncogenesis', *Journal of Dermatological Science*, 45(3): 153–160. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.11.002.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E. D., Valenzuela, J. G., Charlab, R., Barral-Netto, M. a Ribeiro, J. M. C. (2000) 'Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(6): 740–745. doi: 10.4269/ajtmh.2000.62.740.
- Bartel, D. P. (2018) 'Metazoan MicroRNAs', *Cell*, 173(1): 20–51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006
- Belkaid, Y., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D. L. a Ribeiro, J. M. C. (2000) 'Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly?', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12): 6704–6709. doi: 10.1073/pnas.97.12.6704.
- Berenger, J.-M. a Parola, P. (2017) 'Arthropod Vectors of Medical Importance' *Infectious Diseases*, 1: 104–112.e1. doi: 10.1016/b978-0-7020-6285-8.00012-5

- Billingsley, P. F., Baird, J., Mitchell, J. A. a Drakeley, C. (2006) 'Immune interactions between mosquitoes and their hosts', *Parasite Immunology*, 28(4): 143–153. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00805.x.
- Bishop, J. V., Mejia, J. S., Pérez de León, A. A., Tabachnick, W. J. a Titus, R. G. (2006) 'Salivary gland extracts of *Culicoides sonorensis* inhibit murine lymphocyte proliferation and no production by macrophages', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3): 532-536. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.532
- Borah, S., Goswami, S., Agarwal, M., Rahman, I., Deka, M., Chattopadhyay, P. a Singh, L. (2012) 'Clinical and histopathological study of *Simulium* (blackfly) dermatitis from North-Eastern India - a report', *International Journal of Dermatology*, 51(1): 63–66. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05035.x.
- Brummer-Korvenkontio, H., Lappalainen, P., Reunala, T. a Palosuo, T. (1994) 'Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 93(3): 551–555. doi: 10.1016/S0091-6749(94)70066-4.
- Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Piérard, G., Delville, J.-P., Velu, T. a Goldman, M. (1995) 'Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells', *European Journal of Immunology*, 25(9): 2668–2672. doi: 10.1002/eji.1830250940.
- Calvo, E., Mans, B. J., Ribeiro, J. M. C. a Andersen, J. F. (2009) 'Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10): 3728–3733. doi: 10.1073/pnas.0813190106.
- Cantillo, J. F., Fernández-Caldas, E. a Puerta, L. (2014) 'Immunological aspects of the immune response induced by mosquito allergens', *International Archives of Allergy and Immunology*, 165(4): 271–282. doi: 10.1159/000371349.
- Capinera, J. L. (2008) 'Encyclopedia of entomology', 2, USA: SPringer Verlag, 1484-1485 . ISBN 9781402062421
- Carvalho, A. M., Cristal, J. R., Muniz, A. C., Carvalho, L. P., Gomes, R., Miranda, J. C., Barral, A., Carvalho, E. M. a de Oliveira, C. I. (2015) 'Interleukin 10-dominant immune response and increased risk of cutaneous leishmaniasis after natural exposure to *Lutzomyia intermedia* sand flies', *Journal of Infectious Diseases*, 212(1): 157–165. doi: 10.1093/infdis/jiv020.
- Chagas, A. C., Calvo, E., Pimenta P. F. a Ribeiro, J. M. (2011) 'An insight into the sialome of *Simulium guianense* (Diptera: Simuliidae), the main vector of River blindness disease in Brazil', *BMC Genomics*, 12(1). doi: 10.1186/1471-2164-12-612.
- Chattopadhyay, P., Goyary, D., Dhiman, S., Rabha, B., Hazarika, S. a Veer, V. (2013) 'Immunomodulating effects and hypersensitivity reactions caused by Northeast Indian black fly salivary gland extract', *Journal of Immunotoxicology*, 11(2): 126–132. doi: 10.3109/1547691x.2013.809038.
- Chen, Y.-H., Lee, M.-F., Lan, J.-L., Chen, C.-S., Wang, H.-L., Hwang, G.-Y. a Wu, C.-H. (2005) 'Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwana* (biting midge): Clinical analysis and identification of

- major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60(12): 1518–1523. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00918.x.
- Chen, Y.-H., Lee, M.-F., Tsai, J.-J., Wu, H.-J. a Hwang, G.-Y. (2009) 'Specific IgE and IgG responses and cytokine profile in subjects with allergic reactions to biting midge *Forcipomyia taiwana*', *International Archives of Allergy and Immunology*, 150(1): 66–74. doi: 10.1159/000210382.
- Chen, L. a Flies, D. B. (2013) 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*', 13(4): 227–242. doi: 10.1038/nri3405
- Chiriac, A., Brzezinski, P., Miron, L., Moldovan, C., Podoleanu, C. a Stolnicu, S. (2016) 'Simuliosis - a dermatosis caused by black flies', *Allergology International*, 65(2): 217–218. doi: 10.1016/j.alit.2015.11.005.
- Ciadamidaro, S., Mancini, L. a Rivosecchi, L. (2016) 'Black flies (Diptera, Simuliidae) as ecological indicators of stream ecosystem health in an urbanizing area (Rome, Italy)', *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 52 (2): 269-276. doi: 10.4415/ANN_16_02_20
- Clements, M. F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D. S., Kumar, V., Das, P., Müller, I., Hamilton, G., Volfova, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C. R. a Rogers, M. E. (2010) 'Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5): 801–807. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0336.
- Cohen, S. G. a Zelaya-Quesada, M. (2004). 'Prausnitz and Küstner phenomenon: The P-K reaction', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(3): 705–710. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.039
- Costa, D. J., Favali, C., Clarencio, J., Afonso, L., Conceicao, V., Miranda, J. C., Titus, R. G., Valenzuela, J., Barral-Netto, M., Barral, A. a Brodskyn, C. I. (2004) '*Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells', *Infection and immunity*, 72(3): 1298–1305. doi: 10.1128/IAI.72.3.1298.
- Crisp, H. C. a Johnson, K. S. (2013) 'Mosquito allergy', *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 110(2): 65–69. doi: 10.1016/j.anai.2012.07.023
- Cross, M. L., Cupp, M. S., Cupp, W. S., Ramberg, F. B. a Enriquez, F. J. (1993a) 'Antibody responses of BALB/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: Simuliidae)', *Journal of Medical Entomology*, 30(4): 725–734. doi: 10.1093/jmedent/30.4.725.
- Cross, M. L., Cupp, M. S., Cupp, W. S., Galloway, A. L. a Enriquez, F. J. (1993b) 'Modulation of murine immunological responses by salivary gland extract of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae)', *Journal of Medical Entomology*, 30(5): 928–935. doi: 10.1093/jmedent/30.5.928.
- Cross, M. L., Cupp, E. W. a Enriquez, F. J. (1994) 'Modulation of murine cellular immune responses and cytokines by salivary gland extract of the black fly *Simulium vittatum*', *Tropical medical parasitology*, 45:119-124
- Currie, D. C. a Adler, P. H. (2008) 'Global diversity of black flies (Diptera: Simuliidae) in freshwater', *Hydrobiologia*, 595(1): 469–475. doi: 10.1007/s10750-007-9114-1.
- Demeure, C. E., Brahimi K., Hacini, F., Marchand, F., Péronet, R., Huerre M., Mezard, P. S., Nicolas, J. F., Brey, P., Delespesse, G. a Mécheri, S. (2014) '*Anopheles* mosquito bites activate cutaneous

- mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia', *The Journal of Immunology*, 174(7): 3932–3940. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.3932.
- Elanga Ndille, E., Doucoure, S., Damien, G., Mouchet, F., Drame, P. M., Cornelie, S., Noukpo, H., Yamadjako, S., Djenontin, A., Moiroux, N., Misse, D., Akogbeto, M., Corbel, V., Henry, M. C., Chandre, F., Baldet, T. a Remoue, F. (2012) 'First attempt to validate human IgG antibody response to Nterm-34kDa salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to *Aedes aegypti* bites', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11): 2–8. doi: 10.1371/journal.pntd.0001905.
- Elanga Ndille, E., Doucoure, S., Poinsignon, A., Mouchet, F., Cornelie, S., D'Ortenzio, E., DeHecq, J. B., a Remoue, F. (2016) 'Human IgG antibody response to *Aedes* Nterm-34kDa salivary peptide, an epidemiological tool to assess vector control in Chikungunya and Dengue transmission area', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10 (12): e0005109. doi: 10.1371/journal.pntd.0005109
- Faas, M. M., Sáez, T. a de Vos, P. (2017) 'Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses?', *Molecular Aspects of Medicine*, 55: 9–19. doi: 10.1016/j.mam.2017.01.002.
- Gomes, R. B., Brodskyn, C., de Oliveira, C. I., Costa, J., Miranda, J. C., Caldas, A., Valenzuela, J. G., Barral-Netto, M. a Barral, A. (2002) 'Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* Delayed-Type Hypersensitivity', *The Journal of Infectious Diseases*, 186(10): 1530–1534. doi: 10.1086/344733.
- Gudgel, E. F. a Grauer, C. F. H. (1954) 'Acute and chronic reactions to black fly bites (*Simulium* fly)', *Archives of Dermatology*, 70(5): 609. doi: 10.1001/archderm.1954.01540230059
- Hopp, C. S. a Sinnis, P. (2015) 'The innate and adaptive response to mosquito saliva and *Plasmodium* sporozoites in the skin', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1342(1): 37–43. doi: 10.1111/nyas.12661
- Horner, W. E., Armstrong, M., El-Dahr, J., McCants, M., Reese, G., Kobernick, A. K. a Lehrer, S. B. (2008) 'Prevalence of IgE reactivities in mold-allergic subjects to commercially available fungal enzymes', *Allergy and Asthma Proceedings*, 29(6): 629–635. doi: 10.2500/aap.2008.29.3174.
- Kammoun-Rebai, W., Bahi-Jaber, N., Naouar, I., Toumi, A., Salah, A. B. a Meddeb-Garnaoui, A. (2017) 'Human cellular and humoral immune responses to *Phlebotomus papatasi* salivary gland antigens in endemic areas differing in prevalence of *Leishmania major* infection', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10): 1–21. doi: 10.1371/journal.pntd.0005905.
- Killick-Kendrick, R. (1999) 'The biology and control of Phlebotomine sand flies', *Clinics in Dermatology*, 17(3): 279–289. doi:10.1016/s0738-081x(99)00046-2
- Lehiy, C. J., Resiter-Hendricks, L. M., Ruder, M. G., McVey, D. S. a Drolet, B. S. (2018) 'Physiological and immunological responses to *Culicoides sonorensis* blood-feeding: A murine model', *Parasites and Vectors*. 11(1). doi: 10.1186/s13071-018-2935-0.
- Lerner, E. A., Ribeiro, J. M. C., Nelson, R. J. a Lerner, M. R. (1991) 'Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*', *Journal of Biological Chemistry*, 266(17): 11234–11236.
- Lestina, T., Rohousova, I., Sima, M., de Oliveira, C. I. a Volf, P. (2017) 'Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7): e0005600. doi: 10.1371/journal.pntd.0005600

- Liu, S., Kelvin, D. J., Leon, A. J., Jin, L. a Farooqui, A. (2012) 'Induction of fas mediated caspase-8 independent apoptosis in immune cells by *Armigeres subalbatus* saliva', PLoS ONE, 7(7): 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0041145.
- Lombardo, F., Ronca, R., Rizzo, C., Mestres-Simón, M., Lanfrancotti, A., Currà, C., Fiorentino, G., Borgouin, C., Ribeiro, J. M. C., Petrarca, V., Ponzi, M., Coluzzi, M. a Arcà, B. (2009) 'The *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: an anopheline-specific protein with a blood-feeding role', Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39(7): 457–466. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.04.006
- Malafrente, R. dos S., Calvo, E., James, A. A. a Marinotti, O. (2003) 'The major salivary gland antigens of *Culex quinquefasciatus* are D7-related proteins', Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33(1): 63–71. doi: 10.1016/s0965-1748(02)00168-6
- Marković-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, J., Müller, U. a Schirmer, T. (2000) 'Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom', *Structure*, 8(10): 1025–1035. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00511-6.
- Marzouki, S., Ahmed, M. A., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Aleya-Bouafif, N. B., Namane, A., Hamida, N. B., Salah, A. B. a Louzir H. (2011) 'Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis', American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 84(5): 653–661. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0598
- Marzouki, S., Abdeladhim, M., Abdessalem, C. B., Oliveira, F., Ferjani, B., Gilmore, D., Louzir, H., Valenzuela, J. G. a Ahmed, M. B. (2012) 'Salivary Antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans', PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(11): e1911. doi: 10.1371/journal.pntd.0001911
- Marzouki, S., Kammoun-Rebai, W., Bettaieb, J., Abdeladhim, M., Hadj Kacem, S., Abdelkader, R., Gritli, S., Chemkhi, J., Asian, H., Kamhawi, Salah, A. B., Louzir, H., Valenzuela, J. G. a Ben Ahmed, M. (2015) 'Validation of recombinant salivary protein PpSP32 as a suitable marker of human exposure to *Phlebotomus papatasi*, the vector of *Leishmania major* in Tunisia', PLOS Neglected Tropical Diseases, 9(9): e0003991. doi: 10.1371/journal.pntd.0003991
- Mellanby, K. (1946) 'Man's reaction to mosquito bites', Nature, 158: 554. doi: 10.1038/158554c0
- Mellor, P. S., Boorman, J. a Baylis, M. (2000) 'Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors', Annual Review of Entomology, 45 (1):307–340. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.307
- Menezes, M. J., Costa, D. J., Clarencio, J., Miranda, J. C., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C. a de Oliveira, C. I. (2008) 'Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva', BMC Immunology, 9: 1–8. doi: 10.1186/1471-2172-9-12.
- de Moura, T. R., Oliveira, F., Novais, F. O., Miranda, J. C., Clarencio, J., Follador, I., Carvalho, E. M., Valenzuela, J. G., Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C. a de Oliveira, C. I. (2007) 'Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva', PLoS Neglected Tropical Diseases, 1(2): e84. doi: 10.1371/journal.pntd.0000084.
- Mukbel, R. M., Khasharmeh, R. H., Hijjawi, N. S., Khalifeh, M. S., Hatmal, M. M. a McDowell, M. A. (2016) 'Human immune response to salivary proteins of wild-caught *Phlebotomus papatasi*', Parasitology Research, 115(9): 3345–3355. doi: 10.1007/s00436-016-5094-2.

- Mullen, G. R. a Murphree, C. S. (2019) 'Biting Midges (Ceratopogonidae)', *Medical and Veterinary Entomology*, 213-236. doi: 10.1016/b978-0-12-814043-7.00013-3.
- Müller, M., Carter, S., Hofer, M. J. a Campbell, I. L. (2010) 'Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity - A tale of conflict and conundrum', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(5): 368–387. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01089.x.
- Noriega, R., Ramberg, F. B., a Hagedorn, H. H. (2002) 'Ecdysteroids and oocyte development in the black fly *Simulium vittatum*', *BMC Developmental Biology*, 2: 1–5. doi: 10.1186/1471-213X-2-6.
- Oka, K. a Ohtaki, N. (1989) 'Clinical observations of mosquito bite reactions in man: a survey of the relationship between age and bite reaction', *The Journal of Dermatology*, 16(3): 212–219. doi: 10.1111/j.1346-8138.1989.tb01251.x
- Oliveira, F., Traoré, B., Faye, O., Gilmore, D. C., Keita, S., Traoré, P., Teixeira, C., Coulibaly, C. A., Samake, S., Meneses, C., Sissoko, I., Fairhurst, R. M., Fay, M. P., Anderson, J. M., Doumbia, S., Kamhawi, S. a Valenzuela, J. G. (2013) 'Delayed-type hypersensitivity to sand fly saliva in humans from a leishmaniasis-endemic area of mali is Th 1-mediated and persists to midlife', *Journal of Investigative Dermatology*, 133(2): 452–459. doi: 10.1038/jid.2012.315.
- Orlandi-Pradines, E., Almeras, L., Denis de Senneville, L., Barbe, S., Remoué, F., Villard, C., Cornelie, S., Penhoat, K., Pascual, A., Borgouin, C., Fontenille, D., Bonnet, J., Corre-Catelin, N., Reiter, P., Pagés, F., Laffite, D., Boulanger, D., Simondon, F., Pradines, B., Fusaï, T. a Rogier, C. (2007). 'Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa', *Microbes and Infection*, 9(12-13): 1454–1462. doi: 10.1016/j.micinf.2007.07.012
- Palosuo, K., Brummer-Korvenkontio, H., Mikkola, J., Sahi, T. a Reunala, T. (1997) 'Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites', *International Archives of Allergy and Immunology*, 114(4): 367–372. doi: 10.1159/000237696.
- Peng, Z., Yang, M. a Simons, F. E. R. (1996) 'Immunologic mechanisms in mosquito allergy: Correlation of skin reactions with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens', *Annals of Allergy, Asthma and Immunology. American College of Allergy, Asthma & Immunology*, 77(3): 238–244. doi: 10.1016/S1081-1206(10)63262-0.
- Peng, Z., Li, H. a Simons, F. E. R. (1998) 'Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(4): 498–505. doi: 10.1016/S0091-6749(98)70357-4.
- Peng, Z., Xu, W., James, A. A., Lam, H., Sun, D., Cheng, L. a Simons, F. E. R. (2001) 'Expression, purification, characterization and clinical relevance of rAed a 1—a 68-kDa recombinant mosquito *Aedes aegypti* salivary allergen', *International Immunology*, 13(12): 1445–1452. doi: 10.1093/intimm/13.12.1445
- Peng, Z., Rasic, N., Liu, Y. a Simons, F. E. R. (2002a) 'Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(5): 816–817. doi:10.1067/mai.2002.128736
- Peng, Z., Ho, M. K., Ye, C., Li, C., Estelle, F. a Simons, R. (2002b) 'Evidence for natural desensitization to mosquito salivary allergens-mosquito saliva-specific IgE and IgG levels in 424 infants,

- children, and adolescents', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(1): 271. doi:10.1016/s0091-6749(02)81962-5
- Peng, Z. a Simons, F. E. R. (2004a) 'Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens', *International Archives of Allergy and Immunology*, 133(2): 198–209. doi: 10.1159/000076787.
- Peng, Z., Beckett, A. N., Engler, R. J., Hoffman, D. R., Ott, N. L. a Simons, F. E. R. (2004b) 'Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(5): 1189–1194. doi: 10.1016/j.jaci.2004.08.014.
- Peng, Z., Xu, W., Lam, H., Cheng, L., James, A. A. a Simons, F. E. R. (2006) 'A new recombinant mosquito salivary allergen, rAed a 2: allergenicity, clinical relevance, and cross-reactivity', *Allergy*, 61(4): 485–490. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.00985.x
- Peng, Z. a Simons, F. E. R. (2007) 'Advances in mosquito allergy', *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 7(4): 350–354. doi: 10.1097/ACI.0b013e328259c313.
- Peng, Z., Xu, W. W., Sham, Y., Lam, H., Sun, D., Cheng, L., Rasic, N. F., Guan, Q., James, A. A. a Simons, F. E. R. (2016) 'Mosquito salivary allergen Aed a 3: cloning, comprehensive molecular analysis, and clinical evaluation', *Allergy*, 71(5): 621–628. doi: 10.1111/all.12812
- Poinsignon, A., Cornelie, S., Ba, F., Boulanger, D., Sow, Ch., Rossignol, M., Sokhna, Ch., Cisse, B., Simondon, F. a Remoue, F. (2009) 'Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites', *Malaria Journal*, 8(1): 1–8. doi: 10.1186/1475-2875-8-198.
- Pushpanjali, Thakur, A. K., Purkait, B., Jamal, F., Singh, M. K., Ahmed, G., Bimal, S., Kumar, V., Singh, S. K., Keshri, S., Das, P. a Narayan, S. (2016) 'Direct evidence for role of anti-saliva antibodies against salivary gland homogenate of *P. argentipes* in modulation of protective Th1-immune response against *Leishmania donovani*', *Cytokine*, 86: 79–85. doi: 10.1016/j.cyto.2016.07.017.
- Remoue, F., Alix, E., Cornelie, S., Sokha, Ch., Cisse, B., Doucoure, S., Mouchet, F., Boulanger, D. a Simondon, F. (2007) 'IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children', *Acta Tropica*, 104(2–3):108–115. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.07.011.
- Reunala, T., Brummer-Korvenkontio, H., Räsänen, L., Francois, G. a Palosuo, T. (1994) 'Passive transfer of cutaneous mosquito-bite hypersensitivity by IgE anti-saliva antibodies', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 94(5): 902–906. doi: 10.1016/0091-6749(94)90158-9.
- Ribeiro, J. M., Charlab, R. a Valenzuela, J. G. (2001) 'The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*.' *The Journal of experimental biology*, 24(6): 693-701. doi: 10.1016/0006-2952(75)90245-2.
- Ribeiro, J. M. C. a Francischetti, I. M. B. (2002) 'Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives', *Annual Review of Entomology*, 48(1): 73–88. doi: 10.1146/annurev.ento.48.060402.102812.
- Ribeiro, J. M. C., Mans, B. J. a Arcà, B. (2010a) 'An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(11): 767–784. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.08.002.

- Ribeiro, J. M. C., Valenzuela, J. G., Pham, V. M., Kleeman, L., Barbian, K. D., Favreau, A. J., Eaton, D. P., Aoki, V., Hans-Filho, G., Rivitti, A. a Diaz, L. A. (2010b) 'An insight into the sialotranscriptome of *Simulium nigrimanum*, a black fly associated with fogo selvagem in South America', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(6):1060–1075. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0769.
- Rogers, K. A. a Titus, R. G. (2003) 'Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses', *Parasite Immunology*, 25(3): 127–134. doi: 10.1046/j.1365-3024.2003.00623.x.
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y. a Volf, P. (2005) 'Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies', *Parasitology*, 130(5): 493–499. doi: 10.1017/S003118200400681X.
- Ronderos, M. M., Díaz, F., Marino, P. I. a Ferreira-Keppler, R. L. (2018) 'Family Ceratopogonidae', *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, 625–659. doi:10.1016/b978-0-12-804223-6.00030-5
- Schaffartzik, A., Weichel, M., Crameri, R., Björnsdóttir, Þ. S., Prisi, C., Rhyner, C., Torsteinsdóttir, S., a Marti, E. (2009) 'Cloning of IgE-binding proteins from *Simulium vittatum* and their potential significance as allergens for equine insect bite hypersensitivity', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(1): 68–77. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.09.017.
- Schaffartzik, A., Marti, E., Crameri, R., & Rhyner, C. (2010) 'Cloning, production and characterization of antigen 5 like proteins from *Simulium vittatum* and *Culicoides nubeculosus*, the first cross-reactive allergen associated with equine insect bite hypersensitivity', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137(1-2): 76–83. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.04.012
- Schaffartzik, A., Hamza, E., Janda, J., Crameri, R., Marti, E. (2012) 'Equine insect bite hypersensitivity: What do we know?', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 147(3–4): 113–126. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.03.017.
- Simons, F. E. R. a Peng, Z. (2005) 'Skeeter syndrome', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(3): 705–707. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70348-9.
- Smith, D. L., Battle, K. E., Hay, S. I., Barker, C. M. a Scott, T. W. (2012) 'Ross, Macdonald, and a theory for the dynamics and control of mosquito-transmitted pathogens', *PLoS Pathogens*, 8(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1002588.
- Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J.C., Alcantara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C.R., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M. a Barral, A. (2010) 'Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3): e649. doi: 10.1371/journal.pntd.0000649.
- Sumova, P., Sima, M., Spitzova, T., Osman, M. E., Guimaraes-Costa, A. B., Oliveira, F., Elnaïem, D. E. A., Hailu, A., Warburg, A., Valenzuela, J. G. a Volf, P. (2018) 'Human antibody reaction against recombinant salivary proteins of *Phlebotomus orientalis* in Eastern Africa', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(12): 1–17. doi: 10.1371/journal.pntd.0006981.
- Sun, D., Mcnicol, A., James, A. A., a Peng, Z. (2006) 'Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: A potential therapeutic platelet aggregation inhibitor', *Platelets*, 17(3): 178–184. doi: 10.1080/095371100500460234.

- Svensjö, E., Saraiva, E. M., Amendola, R. S., Barja-Fidalgo, C., Bozza, M. T., Lerner, E. A., Teixeira, M. M. a Scharfstein, J. (2012) 'Maxadilan, the *Lutzomyia longipalpis* vasodilator, drives plasma leakage via PAC1-CXCR1/2-pathway', *Microvascular Research*, 83(2): 185–193. doi: 10.1016/j.mvr.2011.10.003
- Tabachnick, W. J. (2010) 'Pharmacological factors in the saliva of blood-feeding insects: implications for vesicular stomatitis epidemiology', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916 (1): 444–452. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05324.x.
- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaiem, D. E., Caldas, A., de Souza, A. P., Brodskyn, C. I., de Oliveira, C. I., Mendonca, I., Costa, C. H. N., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S. a Valenzuela, J. C. (2010) 'Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3): 13–15. doi: 10.1371/journal.pntd.0000638.
- Tokura, Y., Tamrua, Y., Takigawa, M., Koide, M., Satoh, T., Sakamoto, T., Horiguchi, D., Yamada, M. (1990) 'Severe hypersensitivity to mosquito bites associated with natural killer cell lymphocytosis', *Archives of Dermatology*, 26(3): 362–368. doi: 10.1001/archderm.1990.01670270094016
- Tsujimoto, H., Gray, E. W. a Champagne, D. E. (2010) 'Black fly salivary gland extract inhibits proliferation and induces apoptosis in murine splenocytes', *Parasite Immunology*, 32(4): 275–284. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01186.x.
- Vinhas, V., Andrade, B. B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda, J. C., Báfica, A., Barral, A. a Barral-Netto, M. (2007) 'Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*', *European Journal of Immunology*, 37(11): 3111–3121. doi: 10.1002/eji.200737431.
- Vogt, M. B., Lahon, A., Arya, R. P., Kneubehl, A. R., Spencer Clinton, J. L., Paust, S. a Ricco-Hesse, R. (2018) 'Mosquito saliva alone has profound effects on the human immune system', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(5): 1–27. doi: 10.1371/journal.pntd.0006439.
- Weinkopff, T., Oliveira, C. I., Carvalho, A. M., Hauyon-La Torre, Y., Muniz, A. C., Miranda, J. C., Barral, A. a Tacchini-Cottier, F. (2014) 'Repeated exposure to *Lutzomyia intermedia* sand fly saliva induces local expression of interferon-inducible genes both at the site of injection in mice and in human blood', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1): 33. doi: 10.1371/journal.pntd.0002627.
- Xu, W., Simons, F. E. R. a Peng, Z. (1998) 'Expression and rapid purification of an *Aedes aegypti* salivary allergen by a baculovirus system', *International Archives of Allergy and Immunology*, 115(3): 245–251. doi: 10.1159/000023907.
- Internetové zdroje:** World Health Organization [online]. [cit. 2019-08-02]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>